

Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines

著者	出口 靖之
発行年	2008-03-25
その他の言語のタイトル	Imatinib抵抗性細胞株における、dasatinib, nilotinib, INNO-406の比較検討 Imatinib テイコウセイ サイボウカブ ニオケル dasatinib nilotinib INNO-406 ノ ヒカク ケントウ
URL	http://hdl.handle.net/10422/308

氏 名 出 口 靖 之

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 5 5 7 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 0 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib and INNO-406 in
imatinib-resistant cell lines

(Imatinib 抵抗性細胞株における、dasatinib, nilotinib, INNO-406 の
比較検討)

審 査 委 員 主 査 教 授 山 路 昭

副 査 教 授 三 ツ 浪 健 一

副 査 教 授 江 口 豊

論文内容要旨

※整理番号	562	(ふりがな) 氏 名	(でぐち やすゆき) 出口 靖之
学位論文題目	Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines (Imatinib 抵抗性細胞株における、dasatinib, nilotinib, INNO-406 の比較検討)		
<p>【目的】</p> <p>Ph 染色体は、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座 t(9;22)(q34;q21) によって生じる。この転座によって生じる再構成遺伝子 <i>bcr-abl</i> から転写、翻訳される BCR-ABL キメラ蛋白のもつチロシンキナーゼ(TK)の異常な活性化が慢性骨髄性白血病(CML)の発症原因である。ABL TK 阻害剤 imatinib mesylate は、CML 治療を劇的に変化させ、ゲノム創薬最大の成功とも称される。しかし、病期が進行した CML 患者において比較的早期に耐性が出現することが問題となってきた。Imatinib 耐性は、主に <i>abl</i> キナーゼ領域における点突然変異や BCR-ABL 過剰発現に起因する。Imatinib 耐性克服を目的に、dasatinib, nilotinib, INNO-406 などの第二世代 ABL TK 阻害剤が開発された。これら新規阻害剤の ABL への親和性、変異 ABL に対する効果と他の TKs に対する抑制効果が異なることは、それぞれの構造から予想された。</p> <p>Dasatinib と nilotinib の比較分析は、すでに報告されている。しかし INNO-406 も含めた比較は報告されていない。新規 ABL TK 阻害剤の特性を明らかにするため、imatinib, dasatinib, nilotinib, INNO-406 の CML 細胞株(imatinib 耐性株も含め)に対する増殖抑制効果および副作用との関与が懸念される SRC family kinases (SFKs) に対するリン酸化阻害作用について検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>CML 患者から樹立された6種類の細胞株 (K562, BV173, KU812, KT-1, MEG01, MYL)、原因の異なる3種類のimatinib耐性株(P糖蛋白高発現:K562/D1-9, BCR-ABL高発現;K562-IMR, LYN高発現:MYL-R)、野生型BCR-ABLおよびimatinib耐性に関与する変異BCR-ABLを発現する12種類のBa/F3細胞株、野生型およびp53ノックダウン<i>bcr-abl</i> 導入マウス胎児肝細胞 (FLC/wt, FLC/wt/p53^{-/-})、およびネガティブコントロールとして急性骨髄性白血病患者から樹立されたHL60に対する上記4剤の細胞増殖抑制活性を比較した。細胞増殖抑制活性はMTTアッセイで測定し、IC₅₀値をCalcuSynソフトウェアにより求めた。8種類のSFKs (SRC, LCK, LYN, FGR, BLK, FYN, YES, HCK)に対するdasatinibとINNO-406のリン酸化抑制作用について、QuickScout[®]Select Panel を用い測定した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

検討した4剤すべてBCR-ABLを有しないHL60には増殖阻害作用は無かった。Imatinib との比較において、検討したCML細胞株に対してdasatinibは31.1-276.5 (平均98.6) 倍、nilotinibは4.7-17.9 (平均9.85) 倍、INNO-406は6.0-44.3 (平均16.4) 倍の強力な細胞増殖抑制活性を示した。原因の異なる3種類のimatinib耐性細胞株において、dasatinibはnilotinibとINNO-406よりも強い細胞増殖抑制活性を示し、新規阻害剤のなかで最もABLへの親和性が強いことが明らかとなった。NilotinibとINNO-406の比較では、P糖蛋白高発現K562/D1-9に対しnilotinibは比較的強い効果を示し、同剤がP糖蛋白に影響を受けにくいことを示唆した。INNO-406はLYN高発現株のMYL-Rに対してnilotinibより3.1倍強い効果を、LYNに対するINNO-406の効果を示唆した。FLC/wt/p53^{-/-}に対する4種類のABL阻害剤のIC₅₀値は、FLC/wtよりも1.5-4.9倍高くなった。これはABL 阻害作用が部分的にp53経路に依存することを示唆した。

12 種類の変異 BCR-ABL を有する Ba/F3 細胞株において、T315I 変異に対しては、imatinib、dasatinib、nilotinib、INNO-406 のいずれも増殖抑制活性はみられなかった。多くの変異 BCR-ABL 細胞株に対して、dasatinib は他の3剤よりも強い細胞増殖抑制活性を示したが、T315A、F317L、F317A 変異に対しては無効であった。一方 nilotinib および INNO-406 は、T315A、F317L、F317A を生理的な濃度 (2μM 以下) で阻害した。T315A、F317L に対し INNO-406 は nilotinib の2-3 倍の効果を示した。

SFKs 抑制作用について、dasatinib は8種類全ての SFKs のリン酸化を強く抑制したが、INNO-406 は LCK, LYN のみを阻害し、他の SFKs は阻害しなかった。

【考察】

ほとんどの imatinib 非耐性および耐性の CML 細胞株に対して dasatinib は最も強力な効果を示し、次いで INNO-406、nilotinib がこれに続いた。しかし、dasatinib は T315I、T315A、F317L、F317V に対しては無効であり、実際の症例でも imatinib 耐性後 dasatinib を服用した患者でこれら変異を有する症例の蓄積が認められ、問題となりつつある。Nilotinib および INNO-406 は、T315A、F317L、F316V による dasatinib 耐性症例にも有効であることが期待される。残念ながら T315I に対しては、いずれの薬剤も無効であり、今後さらなる新薬の開発が待たれる。

Dasatinib は、すべての SFKs を強く抑制した。SFKs は生体内で多様で重要な役割を担っている。SFKs すべてを恒常的に抑制した場合の人体への影響は不明であり、強い副作用が懸念される。実際 dasatinib 使用症例で、胸水貯留や下痢などが報告されている。INNO-406 は imatinib 耐性に関与するとされる LCK と CML の原因である ABL の両者に比較的高い特異性を示し dasatinib より安全性が高いことが期待される。

【結論】

本研究により、各新規 ABL TK 阻害剤の各 imatinib 耐性原因に対する効果および SFKs に対する特異性が明らかにされた。ポスト imatinib 時代において、今回の研究結果が、各患者に最も適した治療選択アルゴリズムを構築するうえで貴重な情報をあたえるものと考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	562	氏名	出口 靖之
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究は、慢性骨髄性白血病 (CML) の発病原因である <i>bcr-abl</i> 遺伝子異常による ABL 蛋白に対する分子標的治療において、現在用いられているチロシンキナーゼ阻害剤 imatinib の耐性を克服すべく、新規阻害剤の ABL への親和性、変異 ABL に対する効果と SRC family kinases (SFks) に対するリン酸化阻害作用を比較検討したものである。</p> <p>その結果、1) dasatinib は SFks への特異性は最も低い、ABL に対しては最も強い親和性を有している。2) nilotinib は SFks への親和性は低い、ABL には非常に特異性が高い。3) INNO-406 は dasatinib と nilotinib の中間の親和性をもち、ABL に加え、SFks のうち LCK と LYN を抑制した。4) nilotinib と INNO-406 は dasatinib 耐性 BCR-ABL 突然変異株の細胞増殖を阻害した。</p> <p>本研究は、各新規 ABL 阻害剤の特性を明らかにし、ポスト imatinib 時代の各患者に最適な治療選択アルゴリズム構築のために貴重な情報を与えたものである。よって、博士 (医学) の学位を授与するに値すると認められた。</p> <p style="text-align: right;">(平成 20 年 1 月 30 日)</p>			